Untersuchungen über aktive Immunisierung gegen E. coli durch informatorische RNS

Franz Eggemann

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546016_0094

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. K. Betke

Untersuchungen über aktive Immunisierung gegen E. coli durch informatorische RNS.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franz Eggemann

aus

München

1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Marget
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. Betke
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.12.72

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

INHALT

		Seite
Einleitung		1
Grundlagen		2
I.	Zelluläre Mechanismen der Immunantwort	2
II.	Biochemische Mechanismen der Immunantwort	3
III.	Methoden der Immunisierung	4
IV.	Synthese der inf. RNS in vitro	6
V.	Immunisierung durch inf. RNS am Tier	8
Eigene Untersuchungen		8
I.	Material und Methoden	9
	1. Coli-Stämme	9
	2. Informatorische RNS	9
	3. Indirekte Hämagglutination	9
	4. Quantitative Immunglobulin-Bestimmungen	13
	5. Patienten	13
	6. Applikation der i-RNS und Serumgewinnung	13
II.	Ergebnisse	16
	1. Erwachsene	16
	2. Neugeborene	20
Diskussion		21
I.	Erwachsene	21
II.	Neugeborene	22
III.	Allgemeine Gesichtspunkte	27
Zusammenfassung		30
Tabellen		31
Literaturverzeichnis		33

EINLEITUNG

Der Versuch einer Immunisierung gegen E. coli scheint auf den ersten Blick befremdend, handelt es sich doch um einen ubiquitären Keim, der nicht zu jenen epidemienauslösenden Infektionserregern gehört, die eine Impfung erforderlich machen. In der Kinderheilkunde gibt es jedoch triftige Gründe für ein solches Vorgehen: Coli-Bakterien verursachen einen Großteil aller Infektionen beim Neugeborenen (NG) und zwar besonders die gefährlichsten (Meningitis, Sepsis, Pneumonie, Enteritis)[47]; sie führen am häufigsten von allen Infektionserregern im NG-Alter zum Tode und machen so bis zu 40% der letal ausgehenden NG-Infektionen aus[37]. Auch kommt ein Großteil der Harnwegsinfektionen bereits im frühen Säuglingsalter durch E. coli zustande[45].

Trotz aller Fortschritte in der Antibiotikatherapie stellt also E. coli ein ungelöstes Problem für den Pädiater dar[44]. Gerade gramnegativen Keimen scheint das NG besonders ausgeliefert zu sein, weil sich die Antikörper (AK) gegen diese Gruppe von Bakterien hauptsächlich bei den Globulinen der M-Fraktion finden, die das Kind nicht von der Mutter übertragen bekommt, sondern selber bilden muß[35]. Die größte Bedeutung für die erhöhte Anfälligkeit des NG ist aber wohl darin zu sehen, daß die zellständige Immunabwehr in diesem Alter noch nicht ausreichend sensibilisiert ist[5, 35, 42]. Wegen dieser speziellen immunologischen Situation des NG wäre eine Prophylaxe gegen Coli-Infektionen im Sinne einer verbesserten Abwehrlage notwendig. Eine solche Möglichkeit zur Überbrückung dieses für das NG gefährlichen Zeitraums war bisher nicht bekannt und mit den z.Zt. üblichen Impfmethoden auch nicht praktikabel.

Es war deshalb die Aufgabe gestellt, die Immunabwehr von NG gegen Coli-Bakterien in einem möglichst kurzen Zeitraum optimal zu stimulieren. Durch die Untersuchungen von JACHERTS ergaben sich hier neue Aspekte, die in dieser Arbeit berücksichtigt werden sollen.

GRUNDLAGEN

I. Zelluläre Mechanismen der Immunantwort

Antigen (AG), das in den Makroorganismus eingedrungen ist, wird von einem Makrophagen (Histiozyt) phagozytiert. McFARLAND und HEILMAN[46] haben gezeigt, daß sich daraufhin während der ersten Phase der Immunantwort Lymphozyten um diese mit phagozytiertem Material beladenen Histiozyten ansammeln und mit Hilfe von Pseudopoden längeren Kontakt aufnehmen. Eine Weitergabe des AGs scheint dabei nicht zu erfolgen, jedenfalls konnte bisher noch nie antigenes Material in Lymphozyten oder Antikörper-produzierenden Zellen lokalisiert werden[7]. Nach der Kontaktaufnahme mit den Makrophagen entdifferenzieren sich diese immunkompetenten Lymphozyten in RNS-reiche Blastzellen, die sogenannten Immunoblasten oder pyroninophile Zellen[40]. Diese können sich nun vermutlich in Plasmazellen ausdifferenzieren, die als Träger der Immunantwort vom humoralen Typ mit der Synthese der verschiedenen Immunglobuline antworten[6,15]. Eventuell ist auch ein Übergang in kleine Lymphozyten, Träger des "immunologischen Erinnerungsvermögens" (memory cells) möglich[64].

Daß der Immunoblast durch Entdifferenzierung auch Ausgangspunkt der Immunantwort vom verzögerten Typ sein soll[7], ist umstritten, da sich die humorale und die "zellständige" Immunreaktion mit großer Wahrscheinlichkeit aus zwei ontogenetisch verschiedenen Zell-Populationen herleiten[6,16]. Die eine, genetisch thymusabhängige, hauptsächlich aus kleinen Lymphozyten bestehende, ist verantwortlich für die Immunreaktion vom verzögerten Typ. Die andere ist nicht thymusabhängig, sondern vermutlich von den Payerschen Plaques (was bisher jedoch nur für das Kaninchen bewiesen ist), und wird in ihrer letzten Ausdifferenzierung über die pyroninophile Zelle von der humorale Antikörper ausstoßenden Plasmazelle repräsentiert.

II. Biochemische Mechanismen der Immunantwort

Seit FISHMAN et al., ADLER et al.[1,10-12] ist es vor allem JACHERTS et al.[20-29, 32-34], DRESCHER und JACHERTS[9], NEUHOFF et al.[61] in den letzten Jahren gelungen, mehr über die biochemischen Zusammenhänge zu erfahren:

Nach JACHERTS antworten die primären AG-Empfänger, die "effizienten"[9] unter den Makrophagen, auf den Kontakt mit einem AG mit der Synthese von zwei verschiedenen RNS-Typen[34]. Der erste Typ, eine m-RNS, regt die Synthese des sog. Antikörper-analogen Produktes an, das die Zelle nicht verläßt und "gewisse Ähnlichkeit mit sessilen AK" hat[9, 20, 21]. Der zweite Typ der RNS wird als "informatorische" RNS bezeichnet, weil sie die Information für die Synthese des gegen das AG gerichteten AK vom Makrophagen zur lymphatischen Zelle trägt. Dort gibt sie den Anstoß zu humoralen AK-Produktion[10-12, 34]. Diese läuft dann nach den üblichen Prinzipien der Protein-Synthese ab[34].

Durch die informatorische RNS ist die immunologische Spezifität und der Aufbau des gesamten AK-Moleküls festgelegt[1, 23, 25, 28]. Darüber hinaus ist diese RNS in der Lage, die Bildung eines Regulatorproteins anzuregen, das seinerseits eine Neusynthese von informatorischer RNS am Genom der Antikörper-synthetisierenden Zelle bewirkt[24]. Durch die nun in dieser Zelle vorhandene informatorische RNS kommt es zur Bildung von Antikörpern.

Ein wichtiges anderes biologisches Charakteristikum der informatorischen RNS (i-RNS) ist ihre Eigenschaft, latent in den lymphatischen Zellen zu verbleiben. Unter diesen Bedingungen werden keine Antikörper synthetisiert, jedoch verursacht die Anwesenheit der i-RNS im Zytoplasma eine besondere Eigenschaft solcher Zellen: sie sind antigensensibel geworden, d.h. sie haben einen Antigen-spezifischen Rezeptor erworben[31]. Wenn sie mit dem entsprechenden Antigen in Kontakt geraten, kommt es vor erneuter AK-Produktion zu einer stürmischen Synthese von informatorischer RNS, die im Gegensatz zur RNS-Synthese in den primären AG-Empfängern

unter den Makrophagen unabhängig vom Genom der Zelle abläuft. In dieser Situation wird mit Hilfe einer Replikase informatorische RNS an informatorischer RNS dupliziert, ein Vorgang, der Ähnlichkeit mit der Vermehrung einer Virus-Nucleinsäure in infizierten Zellen hat. Das entsprechende Enzym, eine RNS-abhängige RNS-Replikase, konnte bereits isoliert und charakterisiert werden[27, 61]. Es kommt in allen immunkompetenten Zellen vor[31] und bewirkt eine exzessive Vermehrung informatorischer Moleküle nach der ersten Transskription am Genom.

Antikörper-Produktion kann also in primären AG-Empfängern durch Neubildung von informatorischer RNS am Genom in Sinne einer Transskription begonnen werden (Primärreaktion = primary response). Bei einem erneuten Kontakt des AG-Empfängers mit demselben AG kann in sensibilisierten lymphozytären Zellen (Latenzzellen = memory cells) AK-Synthese durch Neubildung von informatorischer RNS an informatorischer RNS mit Hilfe einer Replikase ohne Einschaltung des Genoms - und damit schneller - in Gang gesetzt werden (Sekundärreaktion = booster effect). Abb. 1 veranschaulicht schematisch die beschriebenen Vorgänge.

Eine Besonderheit ergibt sich noch bei Applikation von fremder i-RNS zu einer Lymphozytenkultur: zunächst werden nämlich individual-spezifisch fremde AK synthetisiert, deren allotypische Merkmale Spender-spezifisch sind. Durch die Wirkung eines ebenfalls von der i-RNS codierten Regulatorproteins gelingt den Zellen nach einigen Tagen die Umschaltung auf eine Synthese von AK, die Empfänger-spezifische allotypische Merkmale aufweisen[24, 28]. Es ist anzunehmen, daß in einem Makroorganismus nach der Applikation von informatorischer RNS analoge Vorgänge ablaufen[30]. (Siehe Abb. 2).

III. Methoden der Immunisierung

Durch seine Erkenntnisse über die Rolle der i-RNS beim Immunisierungsvorgang und über die Methoden zur Synthese von i-RNS und von Antikörpern in vitro gelangte JACHERTS erstmals zur praktischen Anwendung

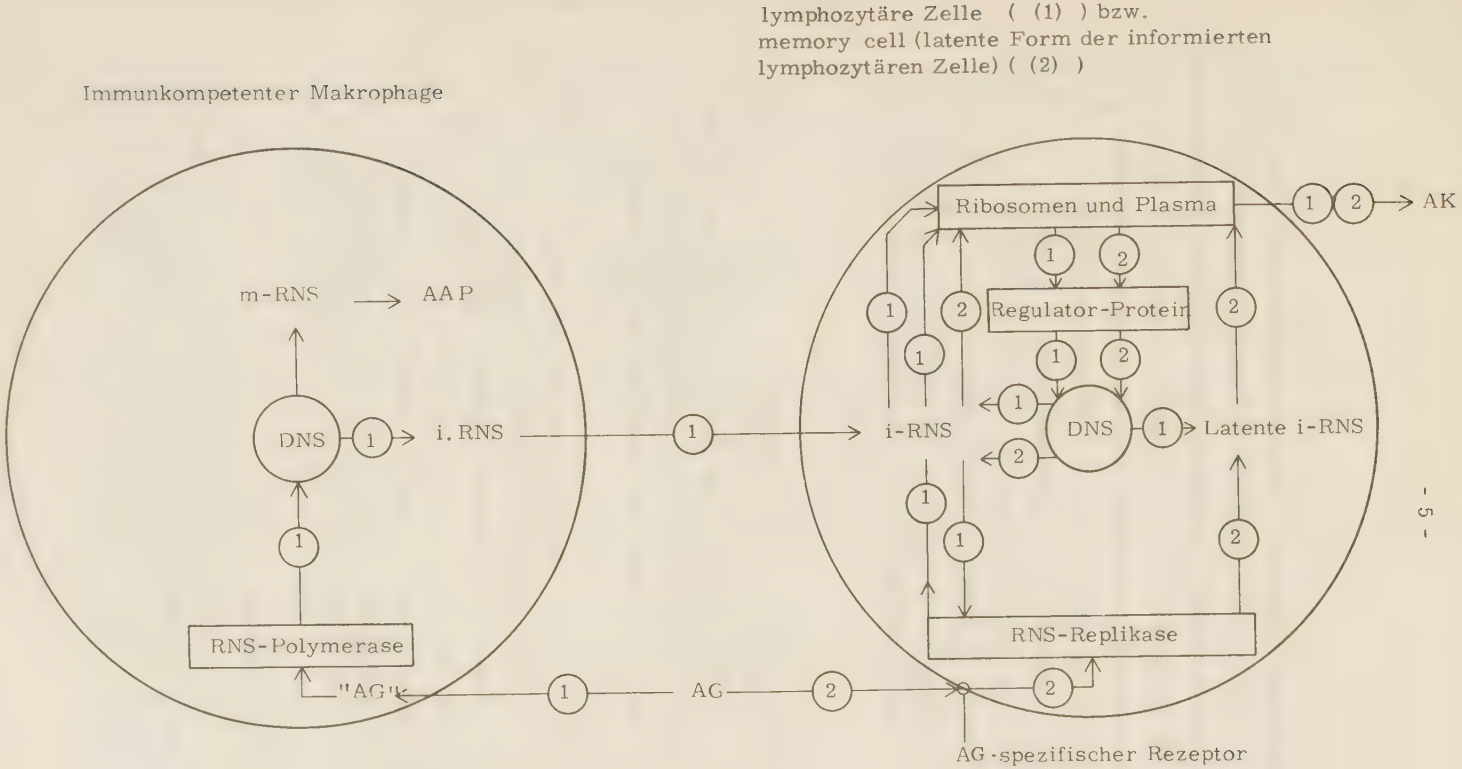


Abb. 1: Biochemische Mechanismen der Immunantwort

1 Primärreaktion (primary response)

2 Sekundärreaktion (booster effect)

bei der Immunisierung in vivo[28, 33].

Die bisherigen Methoden der Immunisierung haben entweder AK von Tier oder Mensch (passive Impfung) oder lebende und abgetötete Erreger bzw. Toxinaufbereitungen als Antigene in den Organismus gebracht (aktive Impfung). Die Gefahren, die bei Verwendung von diesen Fremdproteinen, teilweise virulenten Erregern und verschiedenen Impfstoffzusätzen, in Kauf genommen werden müssen, reichen von den einfachen lokalen und allgemeinen Impfreaktionen zu den organspezifischen, teilweise letalen bei der aktiven Impfung und bis zum anaphylaktischen Schock und der Serumkrankheit bei der passiven Immunisierung[14]. Bei der Verwendung von in vitro gewonnener i-RNS sind derartige Schädigungen des zu immunisierenden Organismus nicht zu erwarten[62, 63], weil allein diese i-RNS appliziert wird.

IV. Synthese der informatorischen RNS in vitro

Soll eine i-RNS in vitro z.B. gegen ein Coli-Misch-AG hergestellt werden, so wird dazu ein Extrakt aus peripheren menschlichen Leukozyten mit dem AG zusammengebracht und schließlich die i-RNS aus dem in-vitro-System isoliert.

Die genauen Einzelheiten sind aus den Arbeiten von JACHERTS[24, 25] ersichtlich. Wichtig ist, daß keine intakten menschlichen Leukozyten verwendet werden, sondern ein "zellfreies System". Dieses besteht aus menschlicher DNS und der sog. "pH-5-Fraktion", die alle Bausteine enthält, die zur Synthese von RNS benötigt werden[38]. Nach erfolgter Synthese wird die i-RNS nach KIRBY isoliert. Durch Chromatographie an einer Sephadex-Säule wird die i-RNS schließlich von niedermolekularen Begleitstoffen getrennt.

Alle Arbeitsgänge sind steril durchzuführen, nicht nur weil die RNS zur Applikation in vivo bestimmt ist, sondern auch, weil schon geringste Mengen der nahezu ubiquitär vorkommenden RNase die i-RNS rasch abbauen würden. Sterilitätskontrollen können vor und nach Abfüllen in Ampullen

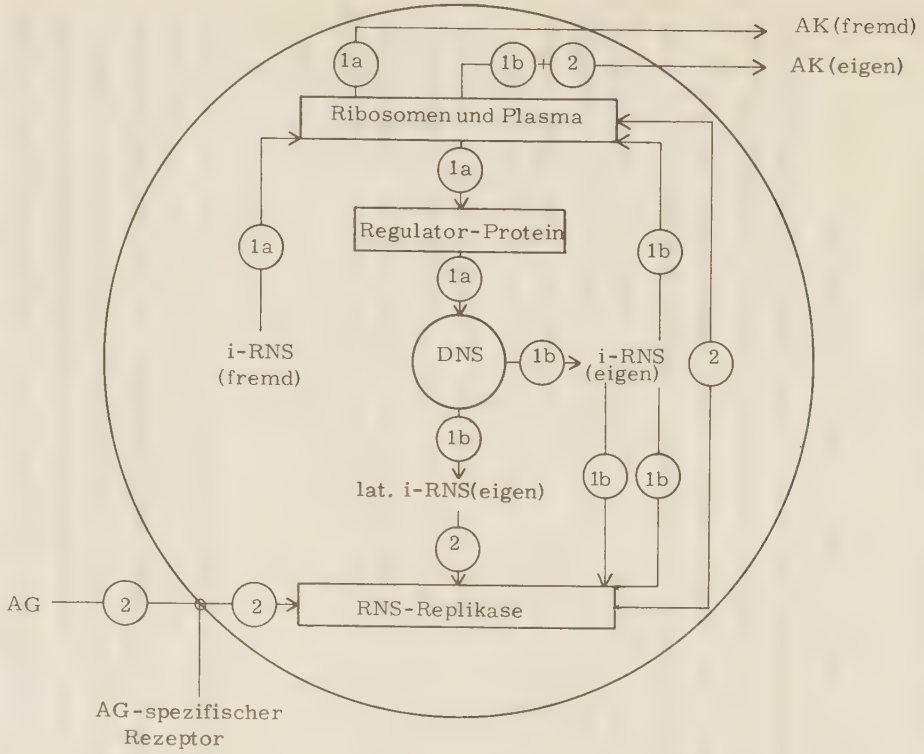


Abb. 2 Biochemische Mechanismen der humoralen Immunantwort bei Immunisierung mit informatorischer RNS

1a Primärreaktion individualspez. fremd 1b Primärreaktion individualspez. eigen 2 Sekundärreaktion

nach den üblichen Methoden vorgenommen werden.

Die Wirksamkeit der i-RNS kann mehrfach geprüft werden: 1. durch Synthese von AK in vitro, die selbst wieder durch übliche immunologische Methoden nachgewiesen werden können; 2. durch Synthese von AK in vivo, d.h. im Tierversuch, falls es sich um tierische RNS handelt.

V. Immunisierung durch informatorische RNS am Tier

Bei Meerschweinchen wurde erstmals die Möglichkeit einer AK-Synthese in vivo nach Applikation von i-RNS bewiesen[28]. Als AG bei der Gewinnung der i-RNS kam Influenza-Virus-Hämagglutinin zur Anwendung. Die Titer wurden mit Hilfe der äußerst sensiblen ACU-Methode[8,33], einem photometrischen Hämagglutinationshemmtest, gemessen. Dabei zeigte sich, daß mit extrem geringen Mengen von i-RNS gearbeitet werden konnte, und daß die AK-Stimulation zwingend an einen bestimmten Bereich der Dosierung der RNS gebunden war. Außerdem fiel auf, daß bei richtiger Dosierung 2 Maxima des AK-Titers zu erzielen waren, einer in den ersten Tagen, der andere nach ca. 3 Wochen; dazwischen und danach pendelten sich die Titer auf einen niedrigeren Wert ein, der aber noch weit über dem Anfangstiter lag. Korrespondierende Resultate ergaben sich auch bei Rhesusaffen[33].

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Nachdem es in Tierversuchen gelungen war, im Empfängerorganismus eine AK-Synthese anzuregen, haben wir uns entschlossen, mit humaner i-RNS beim Menschen eine spezifische Immunstimulierung herbeizuführen. Im Grunde wären dazu viele Antigene (Bakterien und Viren) als Modell in Frage gekommen; als ein besonders wichtiger Modellfall bot sich dabei aber die Verwendung von i-RNS gegen E. coli an. Erstens haben die Coli-Bakterien wie schon erwähnt eine dominierende ätiologische Bedeutung bei bakteriellen Infektionen im Neugeborenenalter, zweitens ist es durch

die Verwendung eines Coli-Misch-Antigens aus nur 8 Stämmen möglich, die Antigene der häufigsten Serotypen unter den Coli-Bakterien - nicht nur bei der Coli-Pyelonephritis[2, 3, 48, 68, 71] - zu erfassen. So wäre es denkbar, mittels der aus diesem polyvalenten AG gewonnenen i-RNS dem Makroorganismus Schutz zu verleihen gegen die häufigsten Coli-Stämme.

I. Material und Methoden

1. Die Referenz-Stämme der Coli-Serotypen 01, 02, 03, 06, 07, 08, 018, 075 für das Coli-Misch-AG zur Herstellung der informatorischen RNS sowie für die indirekte Hämagglutination wurden uns von Dr. F. Ørskov, Statens Seruminstitut, Kopenhagen, Dänemark, zur Verfügung gestellt.

2. Die informatorische RNS gegen das bei uns präparierte Coli-Misch-AG verdanken wir Herrn Prof. Dr. D. Jacherts, Institut für Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Dir. Prof. Dr. D.Jacherts). Soweit nicht in Hannover schon geschehen, wurde die i-RNS von Herrn Oberpharmazierat Rudolf Goepfert, Apotheke der klinischen Universitätsanstalten, München, nach entsprechender Verdünnung auf spritzfertige Ampullen (2 ml) abgezogen und bei Temperaturen unter $-20^{\circ}C$ aufbewahrt. Zur Verwendung kam in 44 Fällen humane i-RNS aus der Synthese mit 10^{-3} verdünntem AG, in 1 Fall mit 10^{-7} verdünntem AG. Die native RNS wurde konzentriert und verdünnt verwendet (siehe Tabelle 1).

3. Indirekte Hämagglutination. Zur Überwachung der Immunantwort auf Stimulierung mit i-RNS bestimmten wir die AK-Titer mit Hilfe der indirekten Hämagglutination (IH). Diese Methode wurde 1947 zuerst beschrieben für die Hämophilus-Gruppe[36], für E.coli erstmals 1951 von HAYES[19]; in der Weiterentwicklung durch NETER et al.[49, 52, 55, 56, 58] hat sie breite Verwendung in der Pädiatrie gefunden. Die indirekte, passive oder konditionierte Hämagglutination beruht auf der Tatsache, daß Bakterien-Antigene, größtenteils Polysaccharide - also bei E.coli somatische oder O-Antige - leicht und ohne besonderes Zutun an der Oberfläche von Erythrozyten adsorbiert werden. Diese veränderten Erythrozyten werden nun von homolo-

gen antibakteriellen Antikörpern aus Patientenserum sichtbar agglutiniert. Gegenüber der gewöhnlichen Bakterienagglutination hat die IH den Vorteil, wesentlich empfindlicher zu sein (z.B. 5-20mal empfindlicher bei E.coli 055)[57]. Die Hämagglutinations-Reaktion wird nicht durch unspezifische Faktoren ausgelöst[59], z.B. wurden bei Coli-Infektionen nur erhöhte Titer des infizierenden Stammes gefunden, während die Titer gegen andere O-Gruppen in normalen Grenzen blieben[3].

Da die in unserem Labor verwendete Methode der IH-Modifikationen gegenüber den etwa von NETER und ANDERSEN verwendeten aufweist, wird sie im Folgenden genau beschrieben.

a) Antiseren: Die Coli-Antiseren von Kaninchen bezogen wir von Prof. Kurt Petersen, Hygiene-Institut der Universität Freiburg; sie wurden nach den üblichen Verfahren[17] gegen die 8 einzelnen Stämme bzw. eine Mischung aus diesen hergestellt.

b) Die Antigene wurden von jedem der obengenannten Stämme einzeln bereitet. Die beimpften Nährböden wurden über Nacht bebrütet und die Bakterien mit je 5 ml physiologischer NaCl-Lösung abgeschwemmt. Die Suspension wurde 1 Stunde bei 120°C autoklaviert und abschließend 1 Stunde bei 3000U/min.zentrifugiert. Der Überstand wurde als gelöstes Antigen zur indirekten Hämagglutination und bei der Synthese der i-RNS verwendet.

c) Erythrozyten: Human-Erythrozyten der Blutgruppe O, Rh+ wurden mindestens dreimal in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, je 10 min. bei 3000U/min. zentrifugiert. Das letzte Sediment wurde in einer Gebrauchsverdünnung von 1:500 angewandt. In früheren Versuchen war in unserem Labor festgestellt worden, daß die Verwendung von Hammelerythrozyten keine Vorteile bietet.

d) Blocktitration (nach BADER): 5 geometrische Verdünnungsreihen des Patientenserums wurden in Konzentrationen von 1:10 bis 1:5120 angesetzt und zwar pro Röhrchen 0,5 ml (1. Röhrchen 0,9 physiologische NaCl-Lösung + 0,1 Serum, dann 0,5 ml überpipettieren; ab 2. Röhrchen ist 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung vorgegeben). Vom AG wurde ebenfalls eine

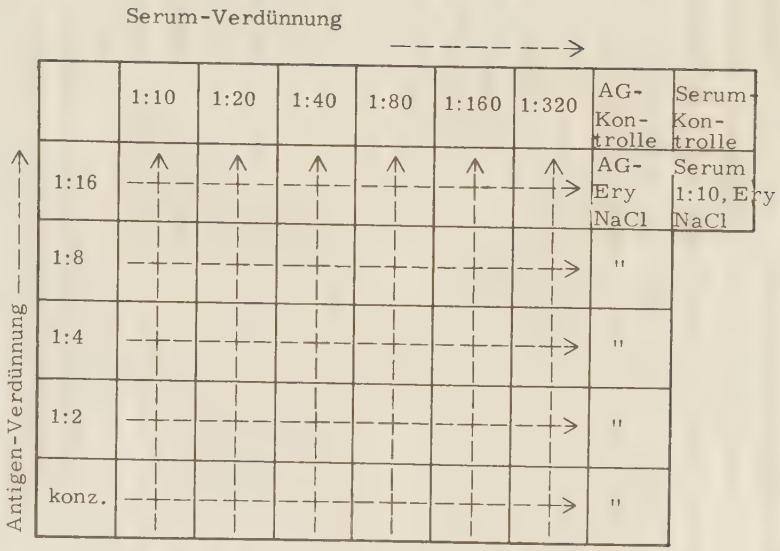


Abb. 3
Blocktitration

Verdünnungsreihe hergestellt (konzentriert, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) und dazu pro Röhrchen gleiche Mengen an Erythrozytenaufschwemmung 1:500 gegeben. Erythrozyten und AG wurden 30 min. im Wasserbad bei 37°C gebunden, anschließend dreimal mit 5-8 ml physiologischer NaCl-Lösung bei 3000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, dann mit physiologischer NaCl-Lösung wieder auf die ursprüngliche Menge aufgefüllt. Vom AG-Erythrozyten-Gemisch wurden dann pro Röhrchen des Patientenserum 0,5 ml hinzugegeben und zwar zu je einer der 5 Verdünnungsreihen des Serums je von einer der 5 AG-Verdünnungen. Der Ansatz wurde nach einem 30-minütigem Wasserbad von 37°C 3 min. lang bei 3000 U/min. zentrifugiert und dann abgelesen. Der positive Titer wurde bei dem Röhrchen mit der stärksten Verdünnung des Patientenserums aus allen AG-Verdünnungen abgelesen, das noch ein Agglutinat zeigte.

Serum-Kontrolle: 0,5 ml Serumverdünnung 1:10 + 0,25 ml Erythrozytenverdünnung 1:500 + 0,25 ml physiologische NaCl-Lösung. Antigen-Kontrollen: 0,25 ml Antigen + 0,25 ml Erythrozytenverdünnung 1:500 + 0,25 ml physiologische NaCl-Lösung. Abb. 3 erläutert schematisch die Versuchsanordnung.

Das Coli-Misch-AG war zusammengesetzt aus den AG der Stämme 01, 02, 04, 06, 07, 08, 018, 075. Die einzelnen Stamm-AG wurden mit Hilfe der Blocktitration gegen Kaninchen-Seren ausgetestet; in das Coli-Misch-AG kamen dann gleiche Mengen der einzelnen AG-Verdünnungen in ihrer jeweils optimalen Konzentration. Diese Mischung wurde gegen Coli-Misch-Serum und gegen die einzelnen Coli-Seren austitriert. Dabei mußte der maximale Titer-Wert aus allen Titrierungen mit den einzelnen Coli-Seren mit dem maximalen Titer gegen das Coli-Misch-AG übereinstimmen, sowie die Titer der einzelnen Antiseren gegen die einzelnen Antigene mit den Titern der vorher zusammengemischten Antigene. Ein solches System hat den Vorteil der absoluten Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit gegenüber Methoden anderer Labors. Zudem wurde eine fast vollkommene Kongruenz der Ergebnisse von Titrierungen mit homologem Coli-AG einerseits und Coli-Misch-AG andererseits erreicht[45].

4. Quantitative Immunglobulin-Bestimmungen. Zur quantitativen Messung der Immunglobuline IgG, IgM und IgA wurde die einfache radiale Immundiffusion nach MANCINI eingesetzt, die in der Literatur ausführlich beschrieben ist[4,43,70]. Zur Verwendung kamen die im Handel erhältlichen Partigen-Immundiffusionsplatten sowie Standard-Humanserum der Behringwerke, Marburg. Als Standard-Werte wurden folgende Verdünnungen des Standard-Humanserums benutzt: IgG 1:20, 1:30, 1:40; IgM 1:1, 1:2, 1:3; IgA 1:3, 1:5, 1:10. Die Auswertung erfolge nach 3 Tagen mit Hilfe eines sonst zur Messung von Antibiotika-Hemmhöfen benutzten Gerätes, das sehr genaue Messungen erlaubt.

5. Patienten. Die Untersuchungen wurden an 11 Erwachsenen und 34 Neugeborenen - davon an 5 Frühgeborenen (Geburtsgewicht > 2000g) - vorgenommen. Es konnten nur Erwachsene herangezogen werden, bei denen der AK-Titer gegen wenigstens einen der im Misch-AG vertretenen Coli-Stämme unter 1:640 lag, um bei gelungener Immunisierung noch einen ausreichenden Spielraum für einen Titeranstieg zu haben. Alle Erwachsenen waren während der gesamten Dauer der Titerbestimmungen gesund. Von den NG kamen nur solche zur Applikation der informatorischen RNS in Frage, bei denen bei Injektion keine Infektion vorlag, eine materno-fetale Transfusion mit Sicherheit ausgeschlossen war, und die im Zeitraum der Titerüberwachung keine Fremdglobuline (Bluttransfusion, Globulinpräparate) substituiert bekamen. Auf diese Weise schieden 6 Patienten aus den Untersuchungen aus (siehe Tabelle 2). Bei einem weiteren NG wurde eine Kontroll-Charge ohne RNS appliziert.

6. Applikation der informatorischen RNS und Serumgewinnung.
Die Applikation der i-RNS erfolgte bei der Patientin J.A. i.v., bei allen übrigen i.m., bei den Erwachsenen im Gluteal- und Oberarmbereich, bei den NG am Oberschenkel. Der Zeitpunkt des Immunisierungsversuchs mußte bei den NG möglichst früh gewählt werden, um die Möglichkeit eines Kontaktes mit Coli-Bakterien vor RNS-Gabe gering zu halten; dies gelang bei 3 NG am Tage der Geburt, bei 17 am 1. Tag post partum, bei

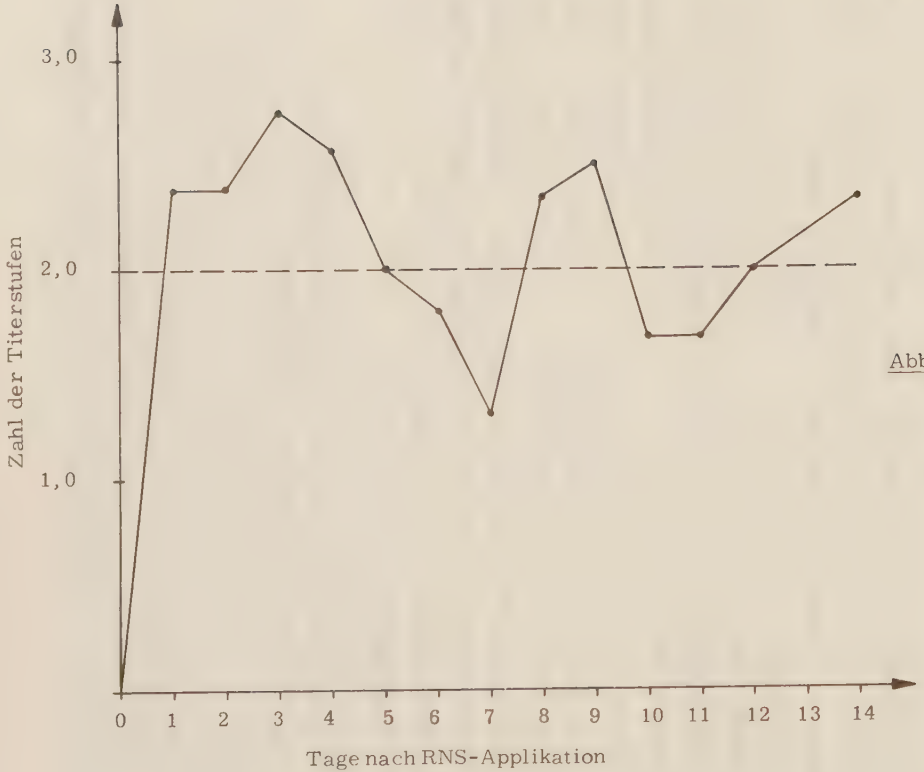
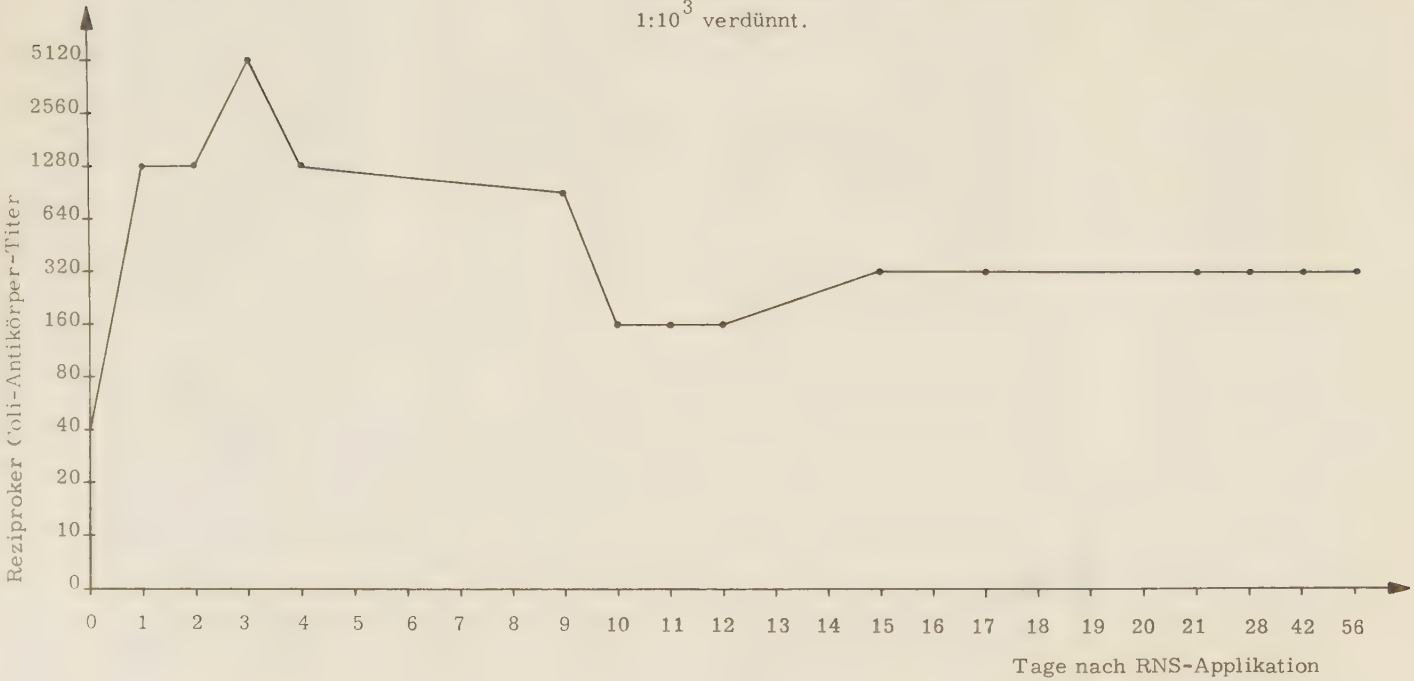


Abb. 4 Mittlere Coli-Antikörpertiter-Anstiege bei Erwachsenen nach Applikation von informatorischer RNS gegen Coli-Misch-Antigen

Abb. 5

Verlauf des Coli-Antikörper-Titers (Serotyp 04)

Patient: M.W.
Injektion: Informatorische RNS gegen Coli-Misch-Antigen (10^{-3}), 1:10^{3} verdünnt.



7 am 2. Tag, bei je 2 am 3. und 4. Tag, bei 1 am 5. Tag und bei je 2 am 9. Tag post partum. Vor RNS-Applikation und danach möglichst täglich wurde Blut zur Titer-Bestimmung durch Venenpunktion entnommen und am selben Tag zentrifugiert. Das abgezogene Serum wurde wie empfohlen von ANDERSEN bis zur Verwendung bei Temperaturen unter -20°C aufbewahrt[3].

II. Ergebnisse

1. Erwachsene: Das Verhalten des Coli-Antikörper-Titers von Erwachsenen nach Injektion der i-RNS ist aus Tabelle 1 ersichtlich: in 8 von 12 Fällen erfolgte ein signifikanter Titeranstieg. Als signifikant angestiegen wurde eine Titerkurve bezeichnet, die eine Erhöhung von mindestens zwei Titerstufen zeigte und diese für einige Tage beibehielt[51]. Bei einer Versuchsperson (J.D.) wurde der AK-Titer gegen zwei Serotypen bestimmt, wobei der Titer gegen 06 einen signifikanten Anstieg zeigte, gegen 04 jedoch nicht. Bei den übrigen Erwachsenen wurde jeweils gegen denjenigen der acht Serotypen des Coli-Misch-Antigens titriert, der den niedrigsten Leerwert aufzuweisen hatte.

Abb. 4 zeigt den Mittelwert der Titeranstiege innerhalb der ersten 14 Tage bei den 8 positiven Fällen; dabei wird deutlich, daß bei den Erwachsenen der steilste Titeranstieg innerhalb der ersten 24 Stunden erfolgte. Das geht auch aus Abb. 5 hervor, die den Verlauf des AK-Titers eines einzelnen Patienten (M. W.) mit dem enormen Anstieg am 1. Tag, dem Maximum am 3. Tag und dem Einpendeln auf einen auch in der 8. Woche noch hohen Wert zeigt.

Bei 9 von 11 Erwachsenen wurde der maximale Titer gegen Coli-Misch-AG mit dem höchsten Titer der Einzelantigene verglichen. Dabei ergab sich vollkommene Kongruenz in 8 Fällen; nur in einem Fall lag das Ergebnis des Einzelantigens höher (um 3 Titerstufen).

Der Serumspiegel von IgG, IgM, IgA blieb bei 3 Erwachsenen mit 7 bzw. 3 Titerstufen Anstieg in normalen Grenzen.

Abb. 6

Verlauf des Coli-Antikörper-Titers (Coli-Misch-Antigen) in Relation zur Konzentration von IgA, IgG, IgM

Patient: D. M.

Injektion: Informatorische RNS gegen Coli-Misch-Antigen (10^{-3}), konzentriert.

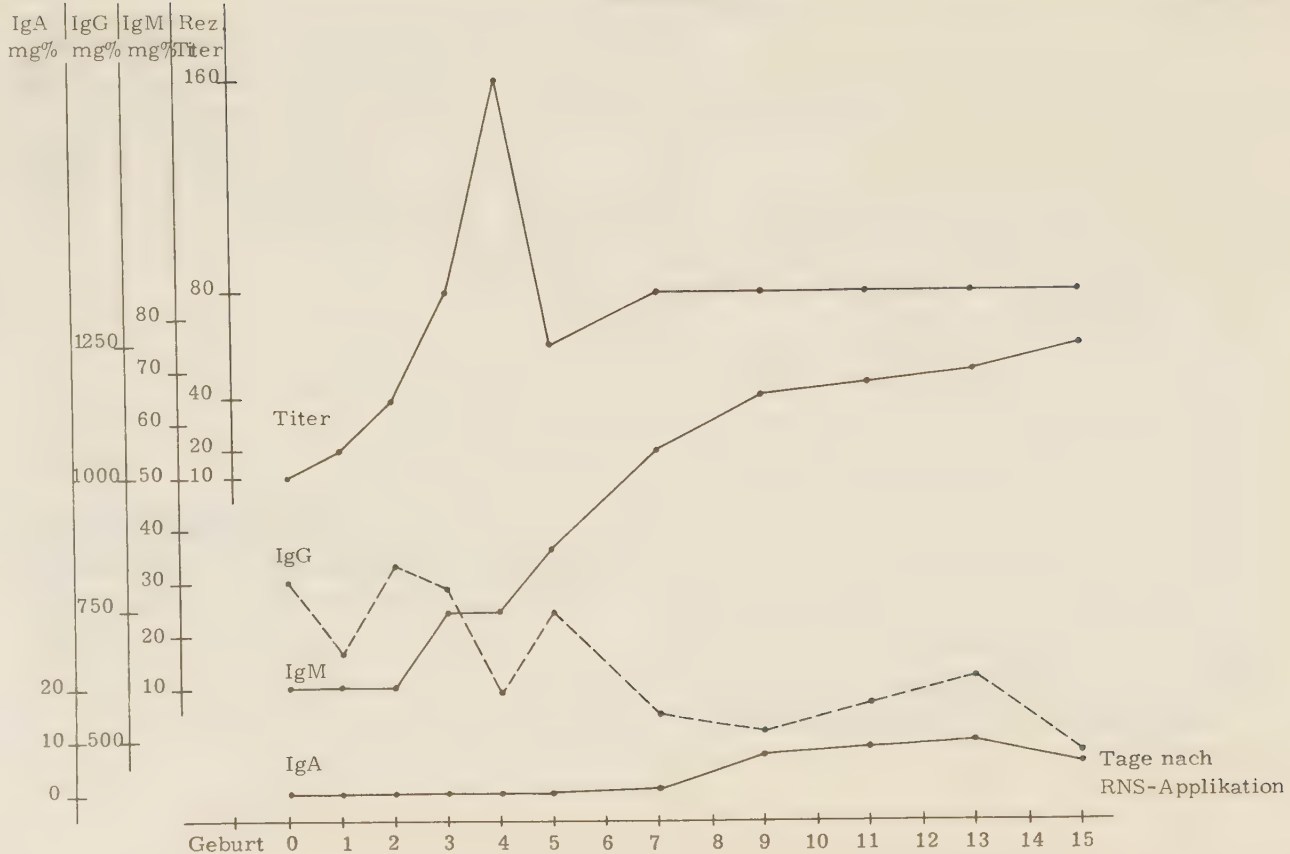


Abb. 7

Verlauf von IgM bei Neugeborenen
nach Applikation von i-RNS gegen Coli-Misch-Antigen
in Relation zu Normalwerten

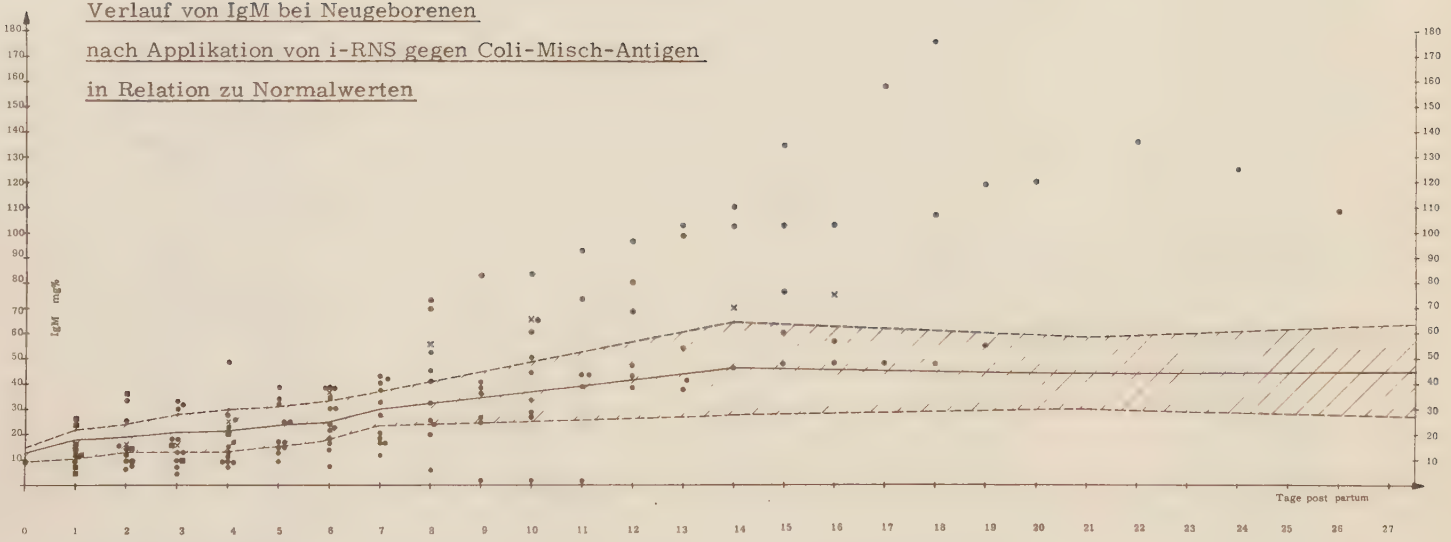
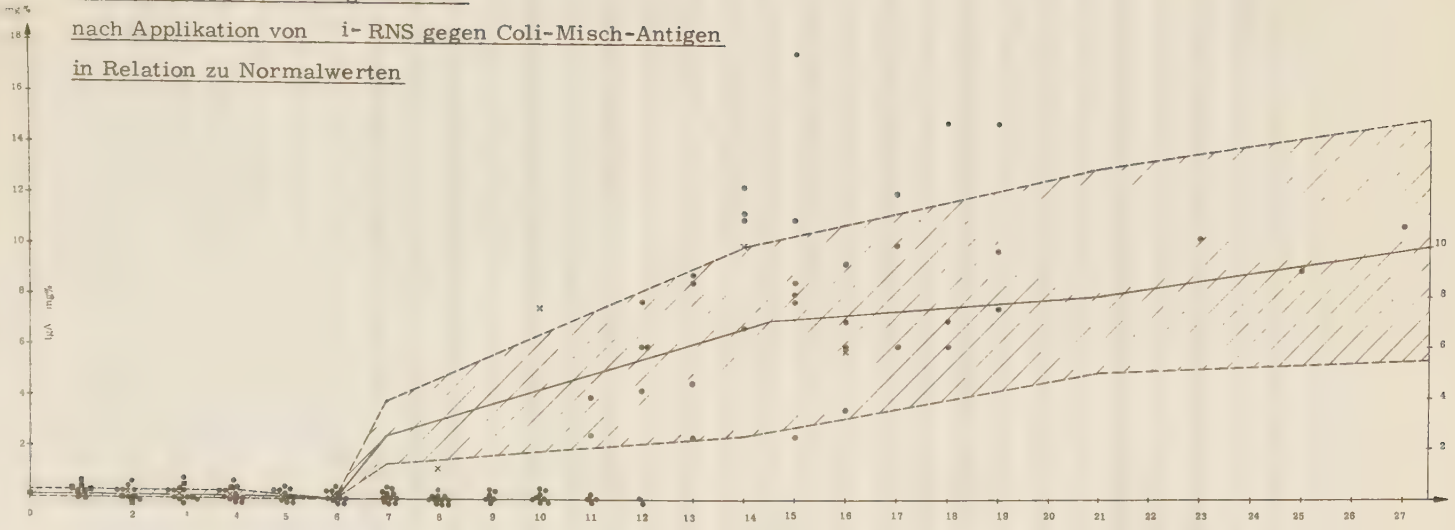


Abb. 8

Verlauf von IgA bei Neugeborenen

nach Applikation von i- RNS gegen Coli-Misch-Antigen

in Relation zu Normalwerten



2. Neugeborene: Von den 28 in den Untersuchungen verbliebenen NG (siehe Tabelle 2) ergab sich nur in einem Fall ein signifikanter Titeranstieg (nach der o.a. Definition). In Abb. 6 ist der Titerverlauf des Patienten D.M. in Relation zur Konzentration der Immunglobuline im Serum zu sehen. In Gegensatz zum Verhalten bei den Erwachsenen erreicht hier der Titer sein Maximum von 4 Stufen Erhöhung nach steilem Anstieg erst am 4. Tag und bleibt bis zum Abschluß der Untersuchungen auf einem erhöhtem Niveau stehen.

Bei 24 NG ohne eindeutig pathologischen Titer ($>1:160$)[45] ergab sich ein Ausgangswert vor Applikation der i-RNS von 1:38,3 (Mittelwert). Dieses Resultat stimmt mit anderen Ergebnissen aus unserem Labor überein[45].

Die Werte für IgM sind beim Patienten D.M. insgesamt etwas erhöht, für IgA ca. ab 10. Tag an der oberen Grenze der Norm; IgG ist unauffällig. Ersteres geht auch aus Abb. 7 und 8 hervor, die den Verlauf der IgM- und IgA-Serumspiegel bei etwa der Hälfte der NG, bei denen i-RNS appliziert wurde, in Relation zu vergleichbaren Normalwerten[69] zeigt. Einen starken IgM-Anstieg bieten nur 3 NG, von denen 2 (M.R., Kn.) bereits einen pathologischen Coli-AK-Ausgangstiter aufwiesen; bei diesen wie auch beim 3. Patienten (S.R., Ausgangstiter 1:80) sind keine Infektionen vor oder in den ersten Tagen nach der Geburt bekannt. Dieselben Patienten haben auch stark erhöhte IgA-Werte. Ein weiteres NG mit einem pathologischen Coli--AK-Ausgangstiter (Ot.) weist normale IgM- und IgA-Spiegel auf. Die mütterlichen Titer konnten in allen Fällen nicht bestimmt werden.

Ein NG, dem eine Kontrolle ohne i-RNS appliziert worden war, zeigte keinen Titeranstieg und blieb mit den IgM- und IgA-Werten unter dem Durchschnitt.

DISKUSSION

I. Erwachsene

Die Ergebnisse bei der aktiven Immunisierung mit artspezifisch gleicher, individualspezifisch jedoch fremder i-RNS gegen E.coli am Erwachsenen zeigen, daß diese Methode mit statistischer Signifikanz, nämlich in 2/3 der Fälle, erfolgreich war.

Dieses Resultat befindet sich in Einklang mit den tierexperimentellen Arbeiten von JACHERTS[28, 33], in denen nach Applikation von i-RNS bei Meerschweinchen und Rhesusaffen ebenfalls in einem hohen Prozentsatz eine Antikörper-Antwort erzielt werden konnte. Daß erstens die Immunantwort der i-RNS selbst zugeschrieben werden muß, und nicht von einer Verunreinigung mit Antigen herrührt, und daß zweitens die gemessenen Titer von spezifischen Antikörpern gebildet werden, geht aus diesen und anderen Arbeiten desselben Autors eindeutig hervor[22-24]. Übereinstimmung findet sich schließlich darin, daß auch beim erwachsenen Menschen keine feste Relation zwischen Dosis der applizierten i-RNS einerseits und dem Prozentsatz der positiven Immunantworten und der Höhe des AK-Titer-Anstiegs andererseits besteht: eine um den Faktor 10^2 veränderte Dosierung bringt keine Alteration der Antikörper-Antwort (siehe Tabelle 1).

Individuelle Unterschiede sind jedoch vorhanden. So steht z.B. der fehlenden Immunantwort in 2 Fällen der immense Antikörpertiter-Anstieg von 7 Stufen einer anderen Versuchsperson (M.W., Abb. 5) gegenüber. Auch sprechen offensichtlich bei demselben Individuum nicht alle Serotypen gleichmäßig an (J.D., Tabelle 1). Eine Erklärung dieser individuellen Unterschiede kann beim derzeitigen Stand der Untersuchungen nicht gegeben werden, es existieren jedoch Hypothesen, deren Richtigkeit durch zukünftige Ergebnisse bewiesen werden muß[33].

Wie Abb. 4 zeigt, erfolgte der steilste Titeranstieg bei den Erwachsenen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Applikation der i-RNS, und zwar übereinstimmend bei fast allen Versuchspersonen. Dieses Ergebnis spricht gegen eine zufällig aufgetretene Infektion und für eine schnelle

Stimulierung des Immunsystems nach Injektion der i-RNS im Sinne einer Booster-Reaktion. Letzteres ist auch deshalb anzunehmen, weil in allen Fällen bereits ein positiver Ausgangstiter gegen die in unserer Umgebung allgemein verbreiteten Coli-Stämme vorhanden war.

Dieser Ausgangstiter wurde von allen erwachsenen Patienten, die überhaupt einen signifikanten Titeranstieg zeigten, während der Beobachtungszeit nicht mehr erreicht oder gar unterschritten, was in Einzelfällen (Beispiel: Abb. 5) bis zur 8. Woche kontrolliert werden konnte. Applikation von i-RNS beim Erwachsenen führt also zu einer Immunstimulation mit langer Wirkung. Wenn angenommen wird, daß erhöhte AK-Titer mit einer verbesserten Immunitätslage einhergehen, muß dies auch für unsere Probanden gelten.

Eine meßbare Änderung der Ig-Werte (IgG, IgM, IgA) konnte erwartungsgemäß bei den Erwachsenen nicht festgestellt werden. Auch sprechen zahlenmäßig unveränderte Ig-Werte nicht gegen eine Zunahme von Antikörpern.

II. Neugeborene

Obwohl bei den 28 Neugeborenen i-RNS in verschiedenen Dosierungen (konzentriert und in Verdünnung bis zum Faktor $1:10^5$) appliziert wurde, um so rein empirisch ein eventuell vorhandenes Konzentrations-Optimum zu finden, ließ sich nur in einem Fall ein signifikanter Titeranstieg erzielen: beim Patienten D.M.. Daß der in Abb. 6 dargestellte Titerverlauf dieses Patienten mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Wirkung der i-RNS zurückzuführen ist, soll im Folgenden aufgezeigt werden.

Die allgemeinen Kriterien für die Wirksamkeit von i-RNS bei der Immunisierung eines Makroorganismus wurden bereits erwähnt und müssen auch hier gelten.

Eine Coli-Infektion der Mutter ist anamnestisch nicht eruierbar. Der Verlauf der Titerkurve beim Kind kann aber ohnehin nicht nur durch übertragene maternale Immunglobuline erklärt werden. Zwar ist bekannt, daß

durch die indirekte Hämagglutination neben IgM auch IgG nachgewiesen wird[18] und daß z.T. daher die hohen Coli-Titer der Neugeborenen stammen. Analog zum physiologischen Abfallen des IgG-Spiegels in den ersten Lebensmonaten müssen jedoch diese von passiv erworbenen Antikörpern gebildeten Titer - sofern sie nicht durch schnell ansteigende adäquate IgM--Neubildung kompensiert werden - entsprechend absinken oder zumindest nicht ansteigen. Dies ist auch bei den weitaus meisten unserer Neugeborenen der Fall und zwar offensichtlich desto deutlicher, je höher die Ausgangstiter waren (siehe Tabelle 2). Nur der Patient D.M. bildet hier eine Ausnahme. Der Ausgangstiter von 1:10 und der schnelle Anstieg auf 1:160 spricht also für aktiv gebildete Immunglobuline, wohl hauptsächlich von der M-Fraktion.

STERZL et al.[67] haben an neugeborenen, keimfrei aufgezogenen Ferkeln gezeigt, daß spontan weder vor Geburt noch bis zum 21. Tag AK gegen gramnegative Bakterien gebildet werden.

Andererseits ist bekannt, daß unter physiologischen Bedingungen Neugeborene als Brustkinder schon vom 2. Tag an eine starke intestinale Coliflora aufweisen[41] und auch bei künstlicher Fütterung schon in der 1. Woche nach der Geburt E.coli im Darm beherbergen[42]. Entsprechend der intestinalen Coliflora nehmen mit dem Alter bei gesunden Kindern auch die Titer zu, was NETER et al.[59] für enteropathogene und KUNIN und ANDERSEN[3] für nicht enteropathogene E.coli gezeigt haben.

Allerdings fand LODINOVA[42] bei gesunden, über 4 Wochen alten Kindern nur gelegentlich aktiv gebildete AK gegen Coli-Bakterien; bei 46% der Kinder erschienen diese erst nach 3 bis 4 Monaten. ANDERSEN[3] gelang es bei 11 nicht infizierten Patienten unter 2 Monaten nicht, gegen E.coli aus dem eigenen Stuhl einen Titer über 1:64 nachzuweisen, während von 105 über 2 Monate alten Kindern fast alle AK gegen diese Antigene besaßen.

Lediglich durch massive experimentelle Besiedlung des Darmtraktes von neugeborenen Ferkeln mit E.coli erzielten STERZL et al.[67] eine AK--Produktion nach 5-10 Tagen, desgleichen LODINOVA[41,42] innerhalb von 14 Tagen post partum gegen E.coli 083 bei 11 neugeborenen Säuglingen.

Im Gegensatz zu AK-Titern gegen E.coli 083, der offensichtlich als besonders starkes AG wirkt - zumal bei Gabe von 15mal 10^8 Coli pro Woche per os - blieben die Titer gegen die übrigen Serotypen der eigenen Darmflora auch hier nahezu negativ.

Ein Titeranstieg wie wir ihn beim Patienten D.M. finden, dürfte also nicht auf die asymptomatische Besiedlung des Darmtraktes mit einem der Serotypen des Coli-Misch-AG zurückzuführen sein.

Freilich wäre dann noch eine prä- oder perinatale Infektion des Kindes auszuschließen. Dabei erhebt sich die Frage, ob NG in diesem Alter bei einer Infektion zur Immunantwort in dem Maße, wie sie bei D.M. erfolgte, überhaupt fähig sind.

Daß ältere Kinder gegen gramnegative Bakterien mit einem Titeranstieg bis zu 3 Titerstufen innerhalb von Tagen reagieren können, geht aus Arbeiten von NETER[50,51,53,60] hervor; die AK-Antwort erfolgte jedoch ausnahmslos erst am Tage nach einer manifesten Infektion.

Auch bei einem 9 Tage alten NG mit einer Coli-Meningitis hat derselbe Autor einen Titeranstieg von 2 1/2 Stufen beobachtet (von 1:2 auf 1:10); im gleichen Zeitraum (9 Tage) änderte sich der Titer der an Coli-Sepsis erkrankten Mutter von 1:160 auf 1:1280[54]. Bei einem NG mit Erwinia-Sepsis im Alter von 2 Wochen stieg der Titer von ursprünglich 1:4 innerhalb von 12 Tagen auf 1:32. Auch bei Frühgeborenen haben FLORMAN und LAMBERTSON[13] zwischen der 5. und 7. Woche nach Beginn einer durch E.coli bedingten Enteritis AK-Titer von 1:160 nachweisen können; freilich waren die Frühgeborenen zu diesem Zeitpunkt schon 5 bis 7 Wochen alt.

Dagegen fand ANDERSEN[3] in Übereinstimmung mit WINBERG et al.[72] bei 36 Säuglingen unter 2 Monaten, die an akuter, teilweise schwerer Pyelonephritis erkrankt waren, bei 28 Patienten keinen Titeranstieg und bei 7 Patienten einen Titeranstieg um 1 1/2 Stufen, jedoch nur bei einem einzigen über 1:64 hinausgehend. Nach HANSON und WINBERG[18] könnte dieses Ergebnis mit einer Hemmung der Produktion von IgM beim Neugeborenen durch die diaplazentar von der Mutter auf den Fetus übertragenen IgG-AK zu er-

klären sein.

Daß jedoch Neugeborene grundsätzlich in der Lage sind, bei aktiver Immunisierung gegen gramnegative Keime mit starker AK-Bildung zu antworten, zeigen die Arbeiten von SMITH et al.[65,66], bei denen nach Applikation von Typhus-Vaccinen binnen 1-2 Wochen Titeranstiege von 0 auf 1:5120 gesehen wurden. Leider sind diese Ergebnisse für die vorliegende Arbeit nur bedingt verwertbar, da hauptsächlich mit der Agglutionationsmethode gearbeitet wurde und fast nur H-Agglutinine nachgewiesen werden konnten; der Einsatz der ind. Hämagglutination erbrachte keine nachweisbaren Titer.

Eine Synopse der in der Literatur angegebenen und vergleichbaren Fälle ergibt, daß Kinder, bei denen mit der indirekten Hämagglutination Titeranstiege gegen Coli-Bakterien gemessen werden konnten, - von experimentellen Sonderfällen abgesehen - manifest erkrankt waren. Der Anstieg erfolgte aber erst Tage bis Wochen nach beginnender Manifestation. Selbst Erwachsene, bei denen nach Coli-Infektion in der Regel eine Booster-Reaktion angenommen werden muß, brauchten mindestens 5 Tage, um einen Anstieg von wenigstens 2-3 Titerstufen zu erreichen[54,60]. ANDERSEN[3] fand in Fällen von akuter Pyelonephritis bei Kindern die Titer-Maxima zwischen dem 5. bis 15. Tag nach Beginn der Krankheit. Termingerecht Geborene und Frühgeborene boten innerhalb der ersten 4 Lebenswochen eine maximale Titerzunahme von 3 Stufen und in allen Fällen wurde dabei ein Höchsttiter von 1:32 nicht überstiegen.

Neugeborene scheinen also zu einer Immunreaktion wie sie beim Patienten D.M. beobachtet wurde im Rahmen einer Infektion nicht befähigt zu sein.

Eine manifeste Coli-Infektion war bei D.M. ohnehin nicht vorhanden. Da Titeranstiege erst Tage bis Wochen nach Infektionsbeginn zu erwarten sind, hätte eine pränatale Infektion angenommen werden müssen. Normale Ausgangswerte für IgM und ein negatives IgA sprechen bei unauffälliger Anamnese und klinischer Symptomlosigkeit auch dagegen. Eine vom 5. bis 10. Tag aufgetretene leichte Dyspepsie kann auf keinen Fall für den ge-

messenen Titer verantwortlich gemacht werden, da ihr Beginn zeitlich schon mit dem Titermaximum zusammenfällt.

Die Immunantwort von D.M. auf Applikation von i-RNS kommt der eines Erwachsenen bei Booster-Reaktion gleich. Selbst bei massiver experimenteller Besiedlung des Darmtraktes mit E.coli ist ein solcher Titeranstieg bei NG erst nach Wochen zu erzielen[41,42]. Auch der schnelle Abfall ist ungewöhnlich: nach ANDERSEN[3] dauert dieser bei Kindern mit akuter Pyelonephritis in der Regel bis zu 9 Tage.

Die zur Diskussion stehende Immunantwort von D.M. kann also mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Injektion von i-RNS zurückgeführt werden.

Daß es sich dabei um eine Primärreaktion (primary response) eines Makroorganismus gegen ein AG handelt, mit dem er noch nicht in Kontakt gekommen ist, kann angenommen werden, eine Booster-Reaktion bei unserem derzeitigen Wissen über das Immunsystem des NG nicht mit völliger Sicherheit ausgeschlossen werden. Angenommen kann ferner werden, daß nach Applikation von i-RNS aus Coli-Misch-AG - gewisse individuelle Unterschiede vorausgesetzt - gegen alle Serotypen des Mischantigens etwa gleich hohe Titer gebildet werden.

Die bei den NG gemessenen Ig-Werte besitzen wenig Aussagekraft - das gilt auch beim Patienten D.M. -, weil keine sichere Übereinstimmung zwischen IgM-Spiegel und Titeranstieg existiert. So hat TYMPNER[70] bei einem agammaglobulinämischen Kind mit Hämophilus-influenzae-Infektion nach IgM-Gabe zwar einen Titeranstieg von 0 auf 1:40, jedoch keine sichere Zunahme von IgM beobachtet. Auch besteht keine feste Beziehung zwischen numerischer Höhe von Ig-Spiegeln und Immunitätslage.

Eine Untersuchung, welches der Immunglobuline IgM, IgG oder IgA für den Titeranstieg bei den einzelnen Probanden verantwortlich war, wurde nicht durchgeführt. Es kann jedoch angenommen werden, daß in Anbetracht der bis zu mehreren Wochen erhöht bleibenden Titerkurven einerseits und der Halbwertszeiten für IgM (3-4 Tage) und IgG (20-30 Tage) andererseits neben IgM auch IgG an dem Zustandekommen der Titerkurven

beteiligt ist.

III. Allgemeine Gesichtspunkte

Eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen bei Erwachsenen und Neugeborenen ist nicht zu übersehen. Während die Immunstimulation mit i-RNS bei Erwachsenen - wie vorher schon bei Tieren - zu einem großen Prozentsatz gelang, trifft dies bei NG nur in einem einzigen Fall zu.

Daß dieses Resultat nicht auf ein grundsätzliches Unvermögen des NG zurückzuführen ist, entsprechende AK zu bilden, wurde bereits diskutiert. Die Annahme einer möglichen begrenzten Fähigkeit, AK zu bilden bei Säuglingen unter 2 Monaten (WINBERG et al.[72]) ist jedoch nicht ganz von der Hand zu weisen. Bei ANDERSEN[3] und bei HANSON und WINBERG[18] findet sich auch eine Erklärung für dieses Phänomen: maternale, diaplazentar auf den Fetus übertragene IgG-AK können demnach die Produktion von IgM-AK durch das Neugeborene hemmen. Dies steht im Einklang mit tierexperimentellen Ergebnissen[18] und der Tatsache, daß z.B. unter 36 Säuglingen unter 2 Monaten mit meist massiver Coli-Infektion nur in 1 Fall ein Titer von mehr als 1:64 gemessen werden konnte[3]. Auch SMITH[66] konnte bei NG den suppressiven Einfluß passiv erworbener spezifischer Agglutinine auf die Bildung von AK gegen somatische Antigene beweisen; zudem weist er auf die Hemmung der aktiven Agglutinin-Antwort durch die Anwesenheit passiv erworbener H-Agglutinine hin[65]. Bei Impfung mit Typhus-Vaccine boten demgemäß NG mit Ausgangstitern bis 1:20 nur leicht gehemmte Bildung von aktiven Agglutininen, NG mit Ausgangstitern von 1:40 oder 1:80 jedoch keinerlei erkennbare Immunantwort.

Inwieweit diese Faktoren unsere Ergebnisse beeinträchtigt haben, muß dahingestellt bleiben. Beim Patienten D.M. jedenfalls liegt einer der niedrigsten Ausgangstiter und der niedrigsten IgG-Spiegel von allen NG vor. Da jedoch auch NG, bei denen auf i-RNS-Gabe keine Reaktion erfolgte, ähnliche Konstellation aufweisen, müssen die Resultate auch von anderer Seite beeinflußt worden sein.

Hier sind die vielfachen Schwierigkeiten zu nennen, die auf dem Weg von der Synthese der i-RNS bis zur Interpretation der Titerkurve vorwiegend auf technischem Gebiet bestehen und auch die Ergebnisse bei den Erwachsenen beeinträchtigt haben dürften. Erfahrungsgemäß kommen hier hauptsächlich in Betracht: 1. Wahl der "richtigen" AG-Konzentration bei der i-RNS-Synthese in vitro, 2. die unterschiedliche biologische Aktivität einer jeden RNS-Charge, 3. richtige Dosierung der i-RNS bei Injektion (empirisches Herausfinden der optimalen Immunantwort), 4. Aktivitätsverlust der i-RNS bei Aufbewahrung durch Adsorption an die Ampullenwand, 5. Gefahr des Kontaktes der RNS mit RNase bei der Applikation, 6. Wahl der richtigen Applikationsart. Die Arbeiten von JACHERTS brauchen wohl nicht in Frage gestellt zu werden. Es findet sich keine Publikation, die stichhaltige Beweise gegen die Ergebnisse von JACHERTS enthält.

Der Aktivitätsverlust der i-RNS verdient besondere Aufmerksamkeit, um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Da es möglich ist, daß mit der indirekten Hämagglutination Titeranstiege übersehen werden, könnte die sehr empfindliche ACU-Methode[8] Verwendung finden. Mit Hilfe einer veränderten AG-Herstellung könnten sämtliche AG-Strukturen erhalten bleiben und so bei Herstellung der i-RNS verwendet werden: neben den thermostabilen O-Antigenen auch die thermolabilen H- und K-Antigene; eine neue Methode der Endotoxin-Gewinnung macht sogar die Verwendung des reinen Endotoxins zu diesem Zweck denkbar. Außerdem könnte die Erweiterung des Coli-Misch-AG (etwa durch die enteropathogenen Serogruppen oder die besonders häufigen 0101- und 011-Stämme (MÖSSNER)) auch den Schutz bei i-RNS Applikation noch erweitern.

Sobald eine erneute Verbesserung der Methodik und damit auch eine Verbesserung der Ergebnisse gelungen ist, wäre der Weg offen zu einem neuen vorteilhafteren Verfahren der aktiven Immunisierung.

Zu den oben erwähnten Vorteilen der fehlenden Antigenität von i-RNS den bisherigen Methoden der Immunisierung gegenüber käme das völlige Fehlen von Kontraindikationen; außerdem wäre eine schnelle spezifische

Abwehrsteigerung trotz aktiver Immunisierung möglich: also könnte in die Inkubationszeit hineingeimpft und schon vor Ausbruch der Erkrankung der Abwehrmechanismus voll zur Wirkung gebracht werden. Sogar eine Impfung in die Infektion hinein könnte gefahrlos erfolgen. Schließlich wäre i-RNS ohne Bedenken auch bei Früh- und Neugeborenen anwendbar.

Es wird Aufgabe von künftigen Arbeiten sein, zu prüfen, ob Coli--i-RNS zur Prophylaxe von Coli-Infektionen bei Früh- und Neugeborenen sogar schon vor der Geburt an die Mutter verabreicht werden kann und transplazentar das Kind erreicht. Die Indikationen zur Infektions-Prophylaxe sind in diesem Lebensabschnitt groß[37] und die i-RNS wäre hier den bisher üblichen Methoden weit überlegen. Daneben sollen künftige Untersuchungen klären, inwieweit mit unserer Methode neben dem humoralem Immunsystem auch die spezifische zelluläre Abwehr angeregt wird.

Selbstverständlich kann die Immunitätslage eines Makroorganismus nicht allein durch Titerkurven festgelegt werden. Der Titer - sogar der Titeranstieg - ist nur Hinweis auf einen möglichen, nicht auf einen sicheren Schutz; einen endgültigen Aussagewert hat nur die Belastung, also hier der Belastungsversuch.

Schließlich wäre es möglich, i-RNS gegen alle wichtigen Erreger zu erzeugen, vorausgesetzt daß ein gutes AG herstellbar ist. Besonders wären hier Viren wie Masern und Röteln von Interesse, für die sehr gute immunologische Systeme existieren (JACHERTS, mündl. Mitteilung).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß die vorliegende Studie einen bedeutenden neuen Weg der aktiven Immunisierung weist. Sie demonstriert an Einzelfällen, daß ähnlich wie am Tier mit Hilfe von i-RNS eine rasche Stimulierung spezifischer AK möglich ist, evtl. sogar im Sinne einer Erststimulierung. Damit sind neue Aspekte für die Erzeugung neuartiger Impfstoffe aufgezeigt.

ZUSAMMENFASSUNG

An 28 Neugeborenen und 11 Erwachsenen wurde der Versuch einer aktiven Immunisierung gegen Coli-Bakterien mit Hilfe eines neuen Immunisierungssystems unternommen. Es wurde dabei informatorische RNS appliziert, die in vitro gegen ein Coli-Misch-Antigen hergestellt worden war. Durch Messung der Antikörper-Titer mit Hilfe der indirekten Hämagglutination wurde die Immunantwort der Probanden beurteilt. Bei den Erwachsenen war die Methode der Immunisierung in 8 Fällen erfolgreich, bei den Neugeborenen in einem Fall. Inwieweit der geringe Erfolg bei den Neugeborenen auf altersbedingte Faktoren zurückzuführen ist, wird diskutiert. Diese Methode scheint nach Beseitigung der zahlreichen technischen Probleme Wege zu neuen Immunisierungsverfahren zu eröffnen.

Tabelle 1

Antwort des Coli-Antikörper-Titers beim Erwachsenen nach Injektion von informatorischer RNS gegen Coli-Misch-Antigen in Relation zur Dosierung.

RNS-Verdünnung	AG-Verdünnung	Patient	AG+	reziproker Ausgangstiter	signif. pos + neg -	Titeranstieg max. Zahl d. Titerstufen	Titeränderung am Ende d. Beobachtungszeit (Stufen)	Beobachtungszeit in Tagen
10^{-3}	10^{-3}	M.W.	04	40	+	7	+3	56
"	"	E.FX.	08	40	+	3	+2	57
"	"	E.F.	01	160	-	0	0	21
"	"	J.D.	06	160	+	3	+2	25
.			04	80	-	0	+2	25
"	"	K.L.	08	320	-	1	+1	8
"	"	M.G.	08	20	+	3	+3	63
"	"	S.H.	08	160	+	2	+2	12
10^{-5}	"	L.R.	08	160	+	2	+2	8
"	"	P.E.	04	640	+	3	+3	19
"	"	M.J.	02	160	+	3	+2	12
"	"	K.W.	02	320	-	1	+1	14

+Coli-Serotyp des bei der indirekten Hämagglutination verwendeten Antigens.

Tabelle 2

Antwort des Coli-Antikörper-Titers beim Neugeborenen nach Injektion von informatorischer RNS gegen Coli-Misch-Antigen in Relation zur Dosierung.

RNS-Verdünnung	AG-Verdünnung	Patient	AG^+	reziproker Ausgangstiter	signif. pos + neg -	Titeranstieg max. Zahl d. Titerstufen	Titeränderung am Ende d. Beobachtungszeit (Stufen)	Beobachtungszeit in Tagen
konzentr.	10^{-3}	D.M.	Coli-Misch	10	+	4	+2	15
"	"	R.C. $^{++}$	"	20	-	1	+1	6
"	"	R.V. $^{++}$	"	40	-	1	+1	6
"	"	W.R. $^{++}$	"	20	-	1	0	11
"	"	B.S. $^{++}$	"	> 80	-	0	0	10
"	"	J.A. $^{++}$	"	0	-	0	0	14
"	10^{-7}	S.R.	"	80	-	0	-3	18
10^{-2}	10^{-3}	Pr.	"	80	-	1	+1	3
10^{-3}	"	M.R.	"	320	-	1	0	25
"	"	Me.	"	0	-	0	0	7
"	"	Ot.	"	1280	-	0	-5	7
"	"	Ku.	"	640	-	0	-4	78
"	"	Le.	"	80	-	1	0	14
"	"	H.D.	"	40	-	2	0	16
"	"	S.M.	"	40	-	0	0	7
10^{-4}	"	Es.	"	10	-	2	+2	7
10^{-5}	"	M.B.	"	80	-	0	-3	12
"	"	T.G.	"	40	-	0	-2	9
"	"	Mm.	"	40	-	0	0	3
"	"	R.S.	"	80	-	0	-1	11
"	"	D.C.	"	160	-	0	-1	14
"	"	Ac.	"	10	-	0	0	20
"	"	Ba.	"	0	-	0	0	17
"	"	Ob.	"	80	-	0	-2	17
"	"	H.S.	"	10	-	0	0	12
"	"	Bo.	"	0	-	0	0	7
"	"	S.U.	"	0	-	0	0	19
"	"	Mk.	"	0	-	0	0	6

LITERATURVERZEICHNIS

1. ADLER, F.L., FISHMAN, M., DRAY, S.: Antibody formation initiated in vitro. III. Antibody formation and allotypic specificity directet by ribonucleic acid from peritoneal exudate cells. J. Immunol. 97, 554 (1966)

2. ANDERSEN, H.J.: Studies of urinary tract infections in infancy and childhood. IX. Determination of E.coli antibodies by a polyvalent antigen. Acta Paediat. Scand. 56, 637 (1967)

3. ANDERSEN, H.J.: Clinical studies on the antibody response to E.coli O-antigens in infants and children with urinary tract infection, using a passive haemagglutination technique. Acta Paediat. Scand., Supplement 180 (1968)

4. BECKER, W., RAPP, W., SCHWICK, H.G., STÖRIKO, K.: Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen durch Immunpräzipitation. 3. Einfache radiale Immundiffusion. Z. klin.Chem. 6, Heft 3, 113 (1968)

5. BURR, M.: Dissertation, im Druck (München)

6. COOPER, M.D., PEREY, D.Y., PETERSON, R.D.A., GABRIELSEN, A.E., and GOOD, R.A.: The two-component concept of the lymphoid system. In: Birth Defects, Immunologic Deficiency in Man. Vol. IV, No 1 (1968), The National Foundation

7. DAMESHEK, W.: Immunocytes and immunoproliferative disorders. In: The Thymus: Experimental and Clinical Studies. Ciba Foundation Symposium. Churchill, London (1966)

8. DRESCHER, J.: Use of ether treated influenza virus for antibody titration by means of the photometric ACU method. Amer. J. Epid. 84, No 1, 167 (1966)

9. DRESCHER, J. und JACHERTS, D.: Antikörper-Synthese in vitro. III. Bildung eines Antikörper-analogen Produktes (AAP) nach Stimulierung mit Influenzavirus-Antigen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 199, 315 (1966)

10. FISHMAN, M.: Antibody formation in vitro. J. exp.Med. 114, 837 (1961)

11. FISHMAN, M.,ADLER, F.L.: Antibody formation initiated in vitro. J.exp.Med. 117, 595 (1963)

12. FISHMAN, M., HAMMERSTROM, R.A., BOND, V.P.: In vitro transfer of macrophage RNA to lymph node cells. Nature 198, 549 (1963)

13. FLORMAN, A.L. and LAMBERTSON, G.H.: Escherichia coli 04 hemagglutinin production by three premature infants. J.Mt. Sinai Hosp. 33, 514 (1966)

14. GÄRTNER, H.: Schutzimpfungen. In: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. Herausgeber: Reploh, H., Otte, H.-J. Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart. 3. Auflage (1968)

15. GOOD, R.A. and ZAK, S.J.: Disturbances in gamma globulin synthesis as "experiments of nature". Pediatrics 18, 109 (1956)

16. GOOD, R.A., PETERSON, R.J.A., PEREY, D.Y., FINSTAD, J., COOPER, M.D.: The immunological deficiency diseases of men: consideration of some questions asked by these patients with an attempt at classification. In: Birth Defects, Immunologic Deficiency in Man. Vol. IV, No 1 (1968), The National Foundation

17. HALLMANN, L.: Bakteriologie und Serologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 3. Auflage (1961)

18. HANSON, L.A. und WINBERG, J.: Untersuchungen zum Nachweis differenter Serumantikörper gegen das O-Antigen von E.coli bei Kindern mit Pyelonephritis. In: Pyelonephritis, Forschungsergebnisse. Herausgeber: Losse, H. und Kienitz, M. S. 106. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967)

19. HAYES, L.: Specific serum agglutination of sheep erythrocytes sensitized with bacterial polysaccharides. Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci. 29, 51 (1951). Zitiert nach ANDERSEN (3.)

20. JACHERTS, D.: Antikörpersynthese in vitro. I.Spezifische Stimulierung einer Zellkultur durch Phagen-Receptor-Partikel. Z.med.Mikrobiol. u. Immunol. 152, 1 (1966)

21. JACHERTS, D.: Antikörpersynthese in vitro. II. Stimulierung eines zellfreien Systems (Zusammenfassung) Z.med.Mikrobiol.u.Immunol. 152, 20 (1966)

22. JACHERTS, D.: Antikörpersynthese in vitro. VI. Die manifeste und latente Funktion der informatorischen RNS in der Milzzelle. Z.med.Mikrobiol. u. Immunol. 152, 262 (1966)

23. JACHERTS, D.: Antikörpersynthese in vitro. VII. Über die Wirkung informatorischer RNS-Moleküle in zellfreien Systemen aus Milzzellen. Z.med.Mikrobiol.u.Immunol. 153, 250 (1967)

24. JACHERTS, D.: Antikörpersynthese in vitro. VIII. Über die Wirkung der informatorischen RNS-Moleküle auf die Milzzellkultur. Z.med.Mikrobiol.u.Immunol. 154, 1 (1968)

25. JACHERTS, D.: Antikörpersynthese in vitro. IX. Synthese von informatorischer RNS und Antikörpern in einem zellfreien System aus menschlichen peripheren Leukocyten. Z.med. Mikrobiol.u.Immunol. 154, 245 (1968)

26. JACHERTS, D.: Antikörpersynthese in vitro. X. Information zur Antikörpersynthese in der DNS von nicht-kompetenten Zellen. Z.med.Mikrobiol.u.Immunol. 154, 300 (1969)

27. JACHERTS, D.: Replicase, an enzyme for multiplication of informational RNA. Behringwerk-Mitteilungen, Heft 49, 147 (1969)

28. JACHERTS, D.: Informationsfluß bei der Antikörpersynthese. Münch.med.Wschr. 112, 328 (1970)

29. JACHERTS, D.: The flow of information during primary antibody synthesis. In: Dumonde, D.C. (Editor): The Role of Lymphocytes and Macrophages in the Immunological Response. XIII. International Congress of Haematology, Munich, 1970. Springer Verlag (1971), p.5

30. JACHERTS, D.: Persönliche Mitteilung

31. JACHERTS, D.: Persönliche Mitteilung

32. JACHERTS D. und DRESCHER, J.: Antikörpersynthese in vitro. IV. Multiple Zuständigkeit von Genom und Zelle für immunologische Spezifität des AAP. Z.med. Mikrobiol. u. Immunol. 152, 33 (1966)

33. JACHERTS, D. and DRESCHER, J.: Antibody response in rhesus monkeys and guinea pigs to inoculation with RNA derived from antigenically stimulated cell-free systems. J. Immunol. 104, 746 (1970)

34. JACHERTS, D. und NOLTENIUS, H.: Antikörpersynthese in vitro: V. Die Informationsübertragung von der Antigen-verarbeitenden Zelle auf die Antikörper-produzierende Zelle. Z.med. Mikrobiol. u. Immunol. 152, 112 (1966)

35. JANEWAY, D.A.: Development of the immunologic system. In: Textbook of Pediatrics. Editors Nelson, W.E., Vaughan, V.C., McKay, R.J. 9th Edition. Saunders Company (1969), p. 471

36. KEOGH, E.V., NORTH, E.A., and WARBURTON, M.F.: Hemagglutinins of the haemophilus group. Nature 160, 63 (1947). Zitiert nach ANDERSEN (3.)

37. KIENITZ, M., SCHULTE, M.: Problematik bakterieller Infektionen des Früh- und Neugeborenen. Münch.med.Wschr. 109, 70 (1967)

38. KIRGY, K.S.: Isolation and fractionation of nucleic acids. In: Davidson, J.N., Cohn, W.E.: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 3., New York, London. Academic Press (1964)

39. KUNIN, C.M.: Antibody distribution against nonenteropathogenic E.coli. Relation to age, sex, and breast feeding. Arch.intern.Med. 110, 182 (1962)

40. LEDUC, L.H., COONS, A.H., CONOLLY, J.M.: J.exp.Med. 102, 61 (1955). Zitiert nach DAMESHEK (7.)

41. LODINOVA, R., JOUJA, V., LANC, A.: Experimentelle Besiedlung des Darmtrakts von Neugeborenen mit dem E.coli-Typ 083 und Untersuchungen über die Bildung von Antikörpern. Z.Immun.-Forsch. 133, 229 (1967)

42. LODINOVA, R., JOUJA, V., and LANC, A.: Influence of the intestinal flora on the development of immune reactions in infants. J.Bact. 93, 797 (1967)

43. MANCINI, G., CARBONARA, A.O., HEREMANS, J.F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immundiffusion. Immunochem. 2, 235 (1965)

44. MARGET, W.: Zur Frage der Therapie und Prophylaxe schwerer Infektionen im Neugeborenenalter. Dtsch.med.Wschr. 92, 1848 (1967)

45. MARGET, W., LEUTHNER, G., SCHÖBER, J.G., ADAM, D., BELOHRADSKY, B.H.: A new handy serologic screening test for detecting pyelonephritis in infants (method and screening studies). 8th International Congress of Pediatrics, Vienna. Nephrology and Urology, Vol. 10, 125 (1971)

46. McFARLAND, W., HEILMAN, D.H.: Nature 205, 887 (1965). Zitiert nach DAMESHEK (7.)

47. McKAY, R.J.: The fetus and the newborn infant. In: Textbook of Pediatrics. Editors Nelson, W.E., Vaughan, V.C., McKay, R.J. 9th Edition. Saunders Company (1969), p. 346

48. MÖSSNER, G., PETERSEN, K.F., GACA, A. und THELEN, A.: O-Gruppenserologie von 111 E.coli-Stämmen. In: Pyelonephritis, Forschungsergebnisse. Herausgeber: Losse, H. und Kienitz, M. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967), S. 114

49. NETER, E.: Bacterial hemagglutination and hemolysis. Bact.Review 20, 166 (1956)

50. NETER, E.: The antibody response of children with enteropathogenic Escherichia coli infection. Hawaii med.J.25, 137 (1965)

51. NETER, E.: Indirect bacterial hemagglutination, and its application to the study of bacterial antigens and serologic diagnosis. Path.Microbiol. 28, 859 (1965)

52. NETER, E.: Bacterial hemagglutination tests. In: Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. Editors Frankel, S., Reitman, S., and Sonnenwirth, A.C. 7th Edition. C.V. Mosby Company, St.Louis, Missouri (1970), p. 1554

53. NETER, E.: The immune response of the host: an aid to etiology, pathogenesis, diagnosis, and epidemiology of bacterial infections. Yale J.Biol.Med. (to be published)

54. NETER, E.: Persönliche Mitteilung

55. NETER, E., BERTRAM, L.F., and ARBESMAN, C.E.: Demonstration of Escherichia coli 055 and 0111 antigens by means of hemagglutination test. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 79, 255 (1952)

56. NETER, E., BERTRAM, L.F., ZAK, D.A., MURDOCK, M.R., and ARBESMAN, C.E.: Studies on hemagglutination and hemolysis by Escherichia coli antisera. J.Exp.Med. 96, 1 (1952)

57. NETER, E., ZALEWSKI, N.J., and FERGUSON, W.W.: Escherichia coli hemagglutinin response of adult volunteers to ingested E.coli 055 B_5. Proc. Soc.Exp.Biol.Med. 82, 215, (1953)

58. NETER, E., GORZYNSKI, E.A., ZALEWSKI, N.J., RACHMAN, R., and GINO, R.M.: Studies on bacterial hemagglutination. Amer.J.Pub.Health 44, 49 (1954)

59. NETER, E., WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., GINO, R.M., and GORZYNSKI, E.A.: Demonstration of antibodies against enteropathogenic Escherichia coli in sera of children of various ages. Pediatrics 16, 801 (1955)

60. NETER, E. and SUSKIND, L.: The antibody (hemagglutinin) response as a tool for etiologic diagnosis of diarrheal disease. J. Pediat. 52, 38 (1958)

61. NEUHOFF, V., SCHILL, W.-B., JACHERTS, D.: Nachweis einer RNA-abhängigen RNA-Replicase aus immunologisch kompetenten Zellen durch Mikro-Disc-Elektrophorese. Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. Bd. 351, 157 (1970)

62. PLESCIA, O.J., PALCZUK, N.C., CORA-FIGUEROA, E., MUKHERJEE, A., and BRAUN, W.: Production of antibodies to soluble RNA (sRNA). Biochem. 54, 1281 (1965)

63. PLESCIA, O.J., BRAUN, W., IMPERATO, S., CORA-BLOCK, E., JAROSKOVA, L., and SCHIMBOR, C.: Methylated bovinic serum albumin as a carrier for oligo-and poly-nucleotides. In: Plescia, O.J. and Braun, W. (Editors): Nucleic Acids in Immunology. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1968) p.5

64. SCHNEIDER, C.C.: Antikörperforschung der letzten Jahre. Med. Welt, Nr. 21, 1230 (1969)

65. SMITH, R.T.: Response to active immunization of human infants during the neonatal period. In: Wolstenholme, C.W. (Editor): Ciba Foundation Symposium on Cellular Aspects of Immunity. J. & A. Churchill, Ltd. London (1960), p.348

66. SMITH, R.T. and EITZMAN, D.V.: The development of immune response. Characterization of the response of the human infant and adult to immunization with salmonella vaccines. Pediatrics 33, 163 (1964)

67. STERZL, J., KOSTKA, J., and LANC, A.: Development of bactericidal properties against gram-negative organisms in the serum of young animals. Folia microbiol. 7, 162 (1962)

68. TURCK, M., PETERSDORF, R.G. and FOURNIER, M.R.: The epidemiology of non-enteric Escherichia coli infections: prevalence of serological groups. J.Clin.Invest.41, 1760 (1962). Zitiert nach ANDERSEN (3.)

69. TYMPNER, K.D.: Die Bedeutung der quantitativen Immunglobulinbestimmung (IgM, IgA) für die Diagnostik und Therapie von Infektionen in der Neugeborenen-Periode. Mschr. Kinderheilk. 119, 287 (1971)

70. TYMPNER, K.D., STRAUCH, L., MARGET, W. und PATAT, I.: Quantitative Bestimmungen der IgG, IgA und IgM in Seren eines A-Gammaglobulinämie-Patienten vor und nach Gammaglobulin-Substitution. Klin.Wschr.48, 485 (1970)

71. VOSTI, K.L., GOLDBERG, L.M., MONTO, A.S., and RANTZ, L.A.: Host-parasite interaction in patients with infections due to Escherichia coli. I. The serogrouping of E.coli from intestinal and extraintestinal sources. J.Clin.Invest. 43, 2377 (1964). Zitiert nach ANDERSEN (3.)

72. WINBERG, J., ANDERSEN, H.J., HANSON, L.A., and LINCOLN, K.: Studies of urinary tract infections in infancy and childhood. I. Antibody response in different types of urinary tract infections caused by coliform bacteria. Brit.Med.J.II, 524 (1963)

Herrn Prof. Dr. W. Marget danke ich herzlich für die Überlassung der Arbeit und seine freundliche Unterstützung bei ihrer Abfassung.

Herrn Prof. Dr. D. Jacherts danke ich herzlich für seine großzügige Hilfe bei vielen Fragen und Schwierigkeiten.

Frau G. Leuthner bin ich zu großem Dank verpflichtet für ihre freundliche labortechnische Arbeit.

Herr Dr. D. Adam, Herr Dr. B.H. Belohradsky und Herr Dr. K.D. Tympner haben mich durch wertvolle Hinweise unterstützt.

Lebenslauf

Am 5.12.1941 wurde ich als 2. Kind des Architekten Dipl.-Ing. Friedrich Eggemann und seiner Ehefrau Maria, geb. Lehner, geboren. Von 1948 an besuchte ich die Volksschule an der Leipziger-Straße und trat 1952 in das humanistische Maximiliansgymnasium ein. Von 1953 bis 1961 besuchte ich das humanistische Gymnasium mit Internat in Ettal/Obb. und bestand 1963 das Abitur am Wittelsbacher Gymnasium in München.

Im selben Jahr nahm ich an der Ludwigs-Maximilians-Universität in München das Studium der Humanmedizin auf und absolvierte hier alle medizinischen Prüfungen, 1969 das Staatsexamen mit "sehr gut". Dazwischen hatte ich ein Jahr mit einem Stipendium das DAAD in Leeds/England studiert.

Nach dem Staatsexamen arbeitete ich jeweils mehrere Monate als Medizinalassistent an der Haunerschen Kinderklinik, am Klinikum rechts der Isar (Chirurgie) und an der Medizinischen Poliklinik der Universität. 1971 diente ich als Stabsarzt im verkürzten Dienst bei der Bundeswehr, danach arbeitete ich als Vollassistent am Pathologischen Institut des Städtischen Krankenhauses Harlaching. Seit 1.1.1972 bin ich in Ausbildung an der Radiologischen Abteilung desselben Krankenhauses.